Über fettspaltende Fermente im Pflanzenreiche

(II. Mittheilung)

von

Dr. Wilhelm Sigmund,

Assistenten an der k. k. deutschen technischen Hochschule in Prag.

Aus dem Laboratorium für allgemeine und analytische Chemie an der k. k. deutschen technischen Hochschule in Prag.

Bei meinen weiteren Versuchen über die fettspaltenden Fermente im Pflanzenreiche bestimmte ich die Zunahme an freien Fettsäuren in den Emulsionen ölhaltiger Pflanzensamen.

In dieser Versuchsreihe wurde eine genau abgewogene Menge der zerriebenen Samen bei Gegenwart von Wasser sich selbst überlassen und nach 24 Stunden die Zunahme an freien Fettsäuren massanalytisch bestimmt. Um jedoch die Mitwirkung von Spaltpilzen auszuschliessen, wurde das von Salkowski vorgeschlagene Antisepticum-Chloroformwasser[1] benützt, indem die Emulsionen ausschliesslich unter Anwendung einer abgemessenen Menge von Chloroformwasser hergestellt wurden.

Als Versuchsobjecte dienten hauptsächlich die Samen von *Brassica Napus*, *annua*, *Cannabis sativa*, *Papaver somniferum*, ferner *Camelina sativa*, *Linum usitatissimum* und *Cucurbita Pepo*.

Diese Samen wurden unter folgenden Verhältnissen der Untersuchung unterworfen:

I. Im ruhenden Zustande:

1. lufttrocken,
2. trocken auf die Siedetemperatur des Wassers erhitzt,
3. mit Wasser gekocht.

---

[1] Deutsche medicin. Wochenschrift, 1888, Nr. 16.

II. Im keimenden Zustande:

1. bei 35° C. getrocknet,

2. bei 35° C. getrocknet und dann auf die Siedetemperatur des Wassers erhitzt,

3. mit Wasser gekocht.

Das Zerreiben und Abwägen der Samen erfolgte in allen Fällen im lufttrockenen Zustande.

Die Details der ausgeführten Versuche sind folgende: Genau 5 *g* der zerriebenen Samen wurden mit 10 cm^3 Chloroformwasser in einem Stöpselglase gemischt und bei einer Durchschnittstemperatur von 20° C. stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurden 90 cm^3 Alkohol (96 %) hinzugefügt, einigemale tüchtig geschüttelt, absitzen gelassen und von der überstehenden klaren Flüssigkeit 50 cm^3 in ein Becherglas gebracht, 3 bis 4 cm^3 einer alkoholischen Phenolphtaleïnlösung hinzugefügt und mit $^1/_{10}$-Normalkalilauge titrirt. Gleichzeitig wurden zu 5 *g* desselben Samens unter den ganz gleichen Verhältnissen 10 cm^3 Chloroformwasser und sofort 90 cm^3 Alkohol zugesetzt, wieder einigemale tüchtig geschüttelt, absitzen gelassen und 50 cm^3 der klaren Flüssigkeit wie oben titrirt.[1]

Die ausgeführten Versuche und die dabei erhaltenen Zahlenwerthe sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengestellt.

I. Ruhende Samen.

1. Ruhende lufttrockene Samen.

	Säuregehalt in cm^3 $^1/_{10}$ KOH	Zunahme in	
		cm^3 $^1/_{10}$ KOH	*mg* Ölsäure
Brassica Napus, annua	1·4	3·3	93·06
„ „ „ nach 24h	4·7		

[1] Dass es sich bei diesen Bestimmungen thatsächlich um die Titration von freien Fettsäuren, insbesondere von Ölsäure handelt, bewiesen die angestellten Vorversuche. Wurden z. B. circa 5 *g* zerriebene Sommerrapssamen bei Gegenwart von 10 cm^3 Chloroformwasser nach 24 Stunden mit Alkohol geschüttelt und einige Cubikcentimeter der klaren Lösung in einem Uhrglase auf dem Wasserbade eingedampft, so blieben als Rückstand ölige, mehr oder weniger gelbgefärbte Tröpfchen von saurer Reaction zurück, die alle Eigenschaften der Ölsäure zeigten.

	Säuregehalt in cm^3 $^1/_{10}$ KOH	Zunahme in	
		cm^3 $^1/_{10}$ KOH	*mg* Ölsäure
Cannabis sativa.	1·6	3·4	95·48
„ „ nach 24^h	5·0		
Papaver somniferum.	0·7	2·3	64·86
„ „ nach 24^h	3·0		
Camelina sativa.	1·9	3·2	90·24
„ „ nach 24^h	5·1		
Linum usitatissimum.	0·8	2·3	64·86
„ „ nach 24^h	3·1		
Cucurbita Pepo (geschält) . . .	0·7	2·2	62·04
„ „ „ nach 24^h	2·9		

Auf 1 *g* lufttrockener Samen umgerechnet beträgt die Zunahme in 24 Stunden bei *Brassica Napus, annua* 37·20, *Cannabis sativa* 38·19, *Papaver somniferum* 25·94, *Camelina sativa* 36·09, *Linum usitatissimum* 25·94 und *Cucurbita Pepo* 24·81 *mg* Ölsäure.

Die ausgeführten Versuche ergaben, dass die Samen ein und derselben Species je nach der Herkunft (aus verschiedenen Samenhandlungen oder auch aus derselben, aber in grösseren Zwischenräumen bezogen) nicht übereinstimmende Resultate lieferten; es wurden daher von den erhaltenen Zahlenwerthen, welche ein und dieselbe Samenart lieferte, diejenigen angegeben, welche von jenen Samen herrührten, die bei den ausgeführten Keimversuchen eine relativ gleichmässigere Keimfähigkeit zeigten.

2. Auf die Siedetemperatur des Wassers erhitzte und mit Wasser gekochte Samen. Das Erhitzen im kochenden Wasserbade währte beiläufig 4 Stunden, das Kochen mit Wasser circa anderthalb Stunden auf dem Drahtnetze und dann bis zur vollständigen Entfernung des zugesetzten Wassers auf dem Wasserbade.

Die erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

	α) auf die Siedetemperatur des Wassers erhitzt			β) mit Wasser gekocht		
	Säuregehalt in *cm*³ ¹/₁₀ KOH	Zunahme in *cm*³ ¹/₁₀ KOH	Zunahme in *mg* Ölsäure	Säuregehalt in *cm*³ ¹/₁₀ KOH	Zunahme in *cm*³ ¹/₁₀ KOH	Zunahme in *mg* Ölsäure
Brassica Napus, annua	1·5	2·9	81·78	1·6	0·1	2·82
„ „ „ nach 24^h	4·4			1·7		
Cannabis sativa	1·6	3·2	90·24	1·6	0·4	11·28
„ „ nach 24^h	4·8			2·0		
Papaver somniferum	0·6	2·0	56·40	0·7	0·1	2·82
„ „ nach 24^h	2·6			0·8		

In folgender Tabelle sind die auf 1*g* Samen (im lufttrockenen Zustande) berechneten Zunahmen in *mg* Ölsäure für lufttrockene, trocken auf 100° (beziehungsweise 98—99° C.) erhitzte und mit Wasser gekochte Samen von Sommerraps, Hanf und Mohn, sowie die sich ergebenden Differenzen zusammengestellt.

	lufttrocken	trocken erhitzt	Differenz	mit Wasser gekocht	Differenz
Brassica Napus, annua	37·20	32·27	4·93	1·12	36·08
Cannabis sativa	38·19	36·09	2·10	4·51	33·68
Papaver somniferum	25·94	22·56	3·38	1·12	24·82

Die ausgeführten Versuche führen zu folgenden Resultaten: Aus der Versuchsreihe mit gewöhnlichen lufttrockenen Samen geht hervor, dass zerriebene ölhaltige Pflanzensamen bei Gegenwart von Wasser eine Zunahme ihres Gehaltes an freien Fett-

säuren aufweisen. Dieselbe kann nur der Einwirkung eines löslichen, nicht organisirten Fermentes zugeschrieben werden, denn die Gegenwart von Chloroformwasser schliesst die Mitwirkung eines organisirten Fermentes, insbesondere Spaltpilzes aus. Diese Annahme wird durch die Versuche mit trocken erhitzten und mit Wasser gekochten Samen bestätigt; die ersteren ergaben nämlich eine im Vergleich zu den lufttrockenen Samen nur wenig verringerte Zunahme an freien Fettsäuren, die letzteren dagegen zeigen eine relativ sehr geringe Zunahme ihres Säuregehaltes. Es wird also die fettspaltende Wirkung der im trockenen Zustande auf den Siedepunkt des Wassers erhitzten Samen zwar ein wenig vermindert, aber keineswegs aufgehoben; im feuchten Zustande dagegen wird bei derselben Temperatur ihre Wirksamkeit vollständig vernichtet, denn die Ursache der beobachteten sehr geringen Zunahme des Säuregehaltes gekochter Samen kann nicht mehr fermentativer Natur sein, sondern muss ausschliesslich der bekannten Einwirkung der Eiweisskörper als solcher auf die Fette zugeschrieben werden. Dieses verschiedene Verhalten im trockenen und feuchten Zustande gegen höhere Temperaturen zeigen bekanntlich alle Enzyme: während sie im feuchten Zustande auf etwas über 80° C. erhitzt ihre charakteristische Wirkung verlieren, ertragen sie getrocknet eine Temperatur von 100°, ohne in ihrer Wirksamkeit vernichtet zu werden. Es können daher die in der obigen Versuchsreihe gemachten Beobachtungen als ein neuer Beweis für die Existenz eines fettspaltenden Fermentes im Pflanzenreiche angesehen werden.

II. Keimende Samen.

Die in dieser Versuchsreihe zur Verwendung gekommenen Samen von Sommerraps, Hanf und Mohn wurden, vom Momente des Eintritts der Keimbedingungen an gerechnet, zwei Tage keimen gelassen und der Keimungsprocess sodann unterbrochen. Die Entwicklung war nicht ganz gleichmässig, das Maximum derselben war bei Sommerraps, Mohn, beziehungsweise Hanf: Würzelchen gleich circa dem anderthalbfachen, dem ganzen, beziehungsweise dem halben Durchmesser des betreffenden Samens; Minimum: das eben beginnende Durchbrechen der Samenhaut durch das Würzelchen. Die im Keimen unterbrochenen Samen

wurden zunächst bei circa 35° C. getrocknet, ein Theil sodann durch 3 bis 4 Stunden auf die Siedetemperatur des Wassers erhitzt, ein anderer Theil mit Wasser gekocht und zur Entfernung des überschüssigen Wassers auf dem Wasserbade getrocknet.

Die Bestimmung des Säuregehaltes geschah in ganz analoger Weise wie bei den ruhenden Samen. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Zwei Tage gekeimte Samen	1. bei 35° C. getrocknet			2. trocken auf die Siedetemperatur des Wassers erhitzt			3. mit Wasser gekocht		
	Säuregehalt in *cm*³ $^1/_{10}$ KOH	Zunahme in *cm*³ $^1/_{10}$ KOH	Zunahme in *mg* Ölsäure	Säuregehalt in *cm*³ $^1/_{10}$ KOH	Zunahme in *cm*³ $^1/_{10}$ KOH	Zunahme in *mg* Ölsäure	Säuregehalt in *cm*³ $^1/_{10}$ KOH	Zunahme in *cm*³ $^1/_{10}$ KOH	Zunahme in *mg* Ölsäure
Brassica Napus, annua	2·0	5·4	152·28	2·0	3·9	109·98	1·6	0·1	2·82
" " " nach 24h .	7·4			5·9			1·7		
Cannabis sativa	2·0	5·0	141·00	2·0	4·0	112·80	1·5	0·3	8·46
" " nach 24h	7·0			6·0			1·8		
Papaver somniferum	1·6	8·2	231·24	1·7	6·5	183·30	1·7	0·3	8·46
" " nach 24h ...	9·8			8·2			2·0		

Die auf 1 *g* zwei Tage gekeimter Samen (im lufttrockenen Zustande) berechnete Zunahme in *mg* Ölsäure in 24 Stunden beträgt bei:

	bei 35° C. getrocknet	trocken erhitzt	Differenz	mit Wasser gekocht	Differenz
Brassica Napus, annua	60·91	43·96	16·95	1·12	59·79
Cannabis sativa	56·40	45·12	11·28	3·38	53·02
Papaver somniferum	92·49	73·32	19·17	3·38	89·11

Die Resultate dieser Versuchsreihe stimmen im Wesentlichen mit den bei den Versuchen mit ruhenden Samen erhaltenen überein, nur tritt bei den gekeimten Samen eine bedeutend grössere Zunahme des Säuregehaltes ein, ferner scheint das Ferment der gekeimten Samen gegen höhere Temperaturen im trockenen Zustande empfindlicher zu sein als das der ruhenden Samen, denn die Differenzen in der dritten Reihe obiger Tabelle sind grösser als die analogen der früheren Versuchsreihe. Die mit Wasser gekochten Samen zeigen dagegen auch hier eine verschwindend kleine Zunahme ihres Säuregehaltes, was wieder ganz besonders für das Vorhandensein und die Mitwirkung eines fettspaltenden Fermentes spricht.

Meine weiteren Versuche über die fettspaltenden Fermente im Pflanzenreiche bezwecken festzustellen, ob die fettzerlegende Wirkung derselben sich ausschliesslich auf die Fette im engeren Sinne, also auf die Glyceride der höheren Fettsäuren beschränkt, oder ob dieselben allgemein auch andere Ester in ihre Componenten zu zerlegen vermögen, wie dies für das fettspaltende Ferment des Pancreas von Nencki nachgewiesen wurde.[1] Als vorläufige Mittheilung über diese Versuchsreihe möchte ich nur die Versuche über die Einwirkung des aus Sommerrapssamen mit

[1] Über die Spaltung der Säureester der Fettreihe und der aromatischen Verbindungen im Organismus und durch das Pancreas. Archiv für experiment. Pathologie und Pharmakologie, Separatabdruck.

Alkohol isolirten fermenthaltigen Körpers auf das den Fetten nahestehende Wallrath erwähnen. Dasselbe wurde in Form von reinem Palmitinsäurecetylester benützt; der Gehalt desselben an freier Palmitinsäure wurde vor den Versuchen durch Titration von 1 *g* Ester in heisser alkoholischer Lösung mit $^1/_{10}$-Normalkalilauge und Phenolphtaleïn als Indicator bestimmt, die verbrauchte Menge $^1/_{10}$-Normalalkali betrug 0·4 cm^3, entsprechend 10·24 *mg* Palmitinsäure. Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, dass das bei 35° C. getrocknete Ferment mit Palmitinsäurecetylester zusammengerieben und bei Gegenwart von Chloroformwasser auf letzteren einwirken gelassen wurde. Die Versuche ergaben eine Spaltung des Palmitinsäurecetylesters, und zwar betrug die Zunahme an freier Palmitinsäure in 24 Stunden durch Einwirkung von 0·33 *g* des Fermentes auf 0·5 *g* Palmitinsäurecetylester bei Gegenwart von 20 cm^3 Chloroformwasser massanalytisch bestimmt, 2·3 cm^3 Normalalkali, entsprechend 58·88 *mg* Palmitinsäure.
